

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento

**Documentos**

ISSN 0103-0205  
Dezembro, 2005

**145**

**Utilização de Cultura de Anteras  
no Melhoramento de Plantas**



**Embrapa**

**República Federativa do Brasil**

*Luiz Inácio Lula da Silva*  
Presidente

**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

*Roberto Rodrigues*  
Ministro

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

**Conselho de Administração**

*Luis Carlos Guedes Pinto*  
Presidente

*Silvio Crestana*  
Vice-Presidente

*Alexandre Kalil Pires*

*Hélio Tollini*

*Ernesto Paterniani*

*Cláudia Assunção dos Santos Viegas*

Membros

**Diretoria Executiva da Embrapa**

*Silvio Crestana*  
Diretor-Presidente

*Tatiana Deane de Abreu Sá*

*José Geraldo Eugênio de França*

*Kepler Euclides Filho*

Diretores Executivos

**Embrapa Algodão**

*Robério Ferreira dos Santos*  
Chefe Geral

*Luiz Paulo de Carvalho*  
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Maria Auxiliadora Lemos Barros*  
Chefe Adjunto de Administração

*José Renato Cortez Bezerra*  
Chefe Adjunto de Comunicação e Negócios



ISSN 0103-0205  
Dezembro, 2005

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Centro Nacional de Pesquisa de Algodão

## ***Documentos 145***

### **Utilização de Cultura de Anteras no Melhoramento de Plantas**

Campina Grande, PB.  
2005

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

**Embrapa Algodão**

Rua Osvaldo Cruz, 1143 – Centenário  
Caixa Postal 174  
CEP 58107-720 - Campina Grande, PB  
Telefone: (83) 3315-4300  
Fax: (83) 3315-4367  
algodao@cnpa.embrapa.br  
<http://www.cnpa.embrapa.br>

**Comitê de Publicações**

Presidente: Luiz Paulo de Carvalho

Secretária: Nívia Marta Soares Gomes

Membros: Cristina Schetino Bastos

Fábio Akiyoshi Suinaga

Francisco das Chagas Vidal Neto

Gilvan Barbosa Ferreira

José Américo Bordini do Amaral

José Wellington dos Santos

Nair Helena Arriel de Castro

Nelson Dias Suassuna

Supervisor Editorial: Nívia Marta Soares Gomes

Revisão de Texto: Máira Milani

Tratamento das Ilustrações: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

Capa: Flávio Tôres de Moura/Maurício José Rivero Wanderley

Editoração Eletrônica: Geraldo Fernandes de Sousa Filho

**1ª Edição**

1ª impressão (2005) 1.000 exemplares

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610)

---

EMBRAPA ALGODÃO (Campina Grande, PB)

Utilização de Cultura de Anteras no Melhoramento de Plantas, por Máira Milani e  
Julita Maria Frota Chagas Carvalho. Campina Grande, 2005

26p. (Embrapa Algodão. Documentos, 145)

1. Fisiologia. I. Milani, M. II. Carvalho, J.M.F.C.III. Título. IV. Série.

CDD 574.1

## **Autores**

### **Máira Milani**

Engº Agr. M.Sc. da Embrapa Algodão, Rua Osvaldo Cruz, 1143 Centenário,  
CEP: 58107-720, Campina Grande, PB.

### **Julita Maria Frota Chaga Carvalho**

Engº Agr. Dr. da Embrapa Algodão









## Sumário

Utilização de Cultura de Anteras no Melhoramento de Plantas .....	11
1. Introdução .....	11
2. Histórico.....	12
3. Fatores envolvidos na produção de duplo-haplóides androgenéticos...	14
3.1. Fisiologia da planta doadora.....	14
3.2. Estádio de desenvolvimento dos micrósporos .....	14
3.3. Pré- tratamento .....	15
3.4. Composição do meio de cultura .....	16
3.5. Fatores físicos.....	18
3.6. Condições de cultura.....	18
3.7. Genótipo da planta doadora .....	18
3.8. Cultura de micrósporos isolados .....	18
3.9. Regeneração de plantas .....	19
3.10. Aclimação de plantas e duplicação de genomas.....	19
4. Variabilidade genética nas culturas <i>in vitro</i> haplóides.....	20
4.1. Suspensões celulares originadas de tecidos androgenéticos .....	20
4.2. Seleção <i>in vitro</i> de variantes originados de micrósporos .....	20
4.3. Variação gametoclinal .....	21
4.4. Transformação genética de espécies utilizando cultura de anteras.....	21

5.Vantagens e limitações da haploidização.....	21
5.1.Economia de tempo .....	22
5.2.Economia de custos.....	23
5.4. Alta dependência do genótipo.....	23
5.5. Variabilidade genética nas populações resultantes da haploidização.....	24
Referências Bibliográficas .....	25

# Utilização de Cultura de Anteras no Melhoramento de Plantas

---

Máira Milani

Julita Maria Frota Chaga Carvalho

## 1. Introdução

As técnicas de cultura de tecidos têm diversas aplicações práticas no melhoramento de plantas. Entre elas: conservação e avaliação de germoplasma, multiplicação de genótipos, introgressão genética, transformação genética, avaliação de resistência a doenças e herbicidas e aceleração de fases do programa de melhoramento como germinação precoce de sementes *in vitro*, cultura de embriões imaturos e cultura de anteras ou micrósporos.

A produção de duplo-haplóides pode ser obtida por cultura de anteras ou micrósporos (grãos de pólen) e permite reduzir o tempo necessário para a produção de linhagens homozigotas, desde que os genótipos tenham potencial genético para regeneração de plantas haplóides ou duplo-haplóides.

Boa parte dos métodos de melhoramento de plantas compreende uma etapa de obtenção de linhagens endogâmicas. Para atingir esse objetivo nos métodos tradicionais são realizadas autofecundações sucessivas, acompanhadas de seleção, para fins de obtenção de homozigotos que contém, em média, cerca de 96,8% de seus genes em homozigose, valor esse que varia em função do número de autopolinizações realizadas (VIEIRA e APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2001).

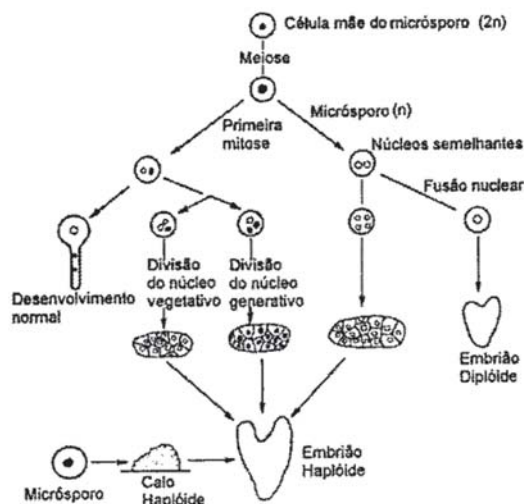
A produção de plantas duplo-haplóides cria condições para acelerar o

melhoramento de plantas nos casos em que os processos de melhoramento requeiram homozigose e as espécies tenham polinização cruzada e os processos de autofecundação tradicionais sejam pouco eficientes. As linhagens duplo-haplóides (DH), por causa da homozigose perfeita, são valiosas para análises genéticas e para pesquisas com marcadores moleculares. Além disso, o progresso recente das técnicas de manipulação de microsporos haplóides abre inúmeras vias de desenvolvimento científico e tecnológico, tanto na área da seleção *in vitro* quanto na transformação genética. A haploidização não é somente útil no desenvolvimento de novos genótipos, deve, também, ser incluída em todos os programas de pesquisa em genética básica de plantas, principalmente de cereais (WENZEL et al., 1992).

## 2. Histórico

As primeiras culturas bem sucedidas de grãos de pólen foram feitas nos anos 1950, usando-se grãos de pólen maduros de várias gimnospermas. Observou-se que uma pequena proporção de grãos era desviada do seu tipo normal de desenvolvimento determinado, ou seja, formação de tubos polínicos e gametas masculinos (Figura 1) e resultava na formação de calos (MANTELL et al., 1994).

O primeiro relato de obtenção de êxito na regeneração de plantas inteiras (haplóides) com o uso desta técnica foi o trabalho desenvolvido por Guha e Mahashwari (1964), com pólen de *Datura innoxia*. Os autores verificaram que



**Fig. 1.** Padrões normal e anormal de desenvolvimento do grão de pólen  
Fonte: Mantell et al.(1994).

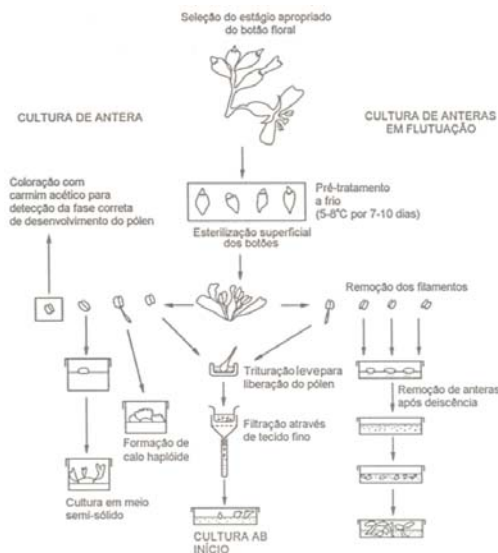
este podia ter seu crescimento induzido, simplesmente pelo cultivo de anteras intactas contendo pólen em desenvolvimento. Além disso, o tipo de crescimento produzido resultava na formação de embrióides, diretamente a partir de grãos de pólen individuais. Estes podiam se desenvolver em plantas inteiras, as quais foram, subsequentemente confirmadas como haplóides verdadeiros (GUHA e MAHASHAWARI, 1967).

Desde então, o cultivo de anteras contendo pólen imaturo tem sido utilizado em algumas espécies economicamente importantes, como trigo, cevada e fumo. Os procedimentos que comumente são usados estão demonstrados na Figura 2, e sofrem variações de acordo com a espécie e o objetivo da pesquisa (MANTELL et al., 1994).

Segundo Mantell et al. (1994), há três abordagens principais:

- cultura de anteras em meio semi-sólido e proliferação de embriões e plântulas derivadas de grãos de pólen, através da deiscência de anteras maduras;
- cultura de anteras em meio líquido e liberação do pólen, levando à formação de embriões e de plântulas diretamente a partir do pólen liberado;
- cultura *ab initio* de pólen imaturo extraído de anteras em desenvolvimento.

**Fig. 2.** Diferentes metodologias que podem ser utilizadas para cultura de pólen e anteras  
Fonte: Mantell et al. (1994).



### **3. Fatores envolvidos na produção de duplo-haplóides androgenéticos**

Segundo Mantell et al. (1994), os determinantes críticos do sucesso da cultura e da produção de plantas são: as condições fisiológicas da planta doadora, o tipo de pré-tratamento aplicado aos botões florais removidos da planta, a fase de desenvolvimento do pólen e a presença ou ausência de reguladores de crescimento suplementares no meio. Desde que sejam providas condições ótimas às plantas e aos explantes, pode-se obter 1-2% de plantas haplóides do total de pólen cultivado, dentro das anteras ou como grãos isolados.

#### **3.1. Fisiologia da planta doadora**

Fatores ambientais como intensidade luminosa, fotoperíodo, temperatura e nutrição interagem entre si, influenciando o estado da planta doadora e o potencial dos grãos de pólen.

A temperatura de crescimento da planta é um fator crucial para o desenvolvimento embriogênico dos micrósporos. Se anteras forem retiradas em temperaturas diferentes do ideal de crescimento da planta, a resposta será inferior ao esperado (PETERS et al., 1999).

#### **3.2. Estádio de desenvolvimento dos micrósporos**

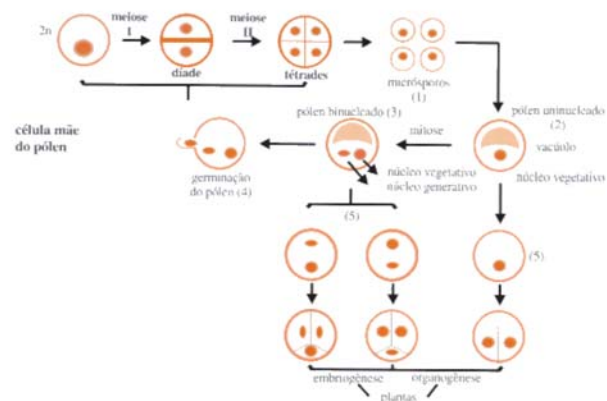
Os micrósporos respondem apenas em uma determinada etapa do seu desenvolvimento, sendo o estado uninucleado o mais adequado para a maioria das espécies (PETERS et al., 1999).

O período crítico na indução do desenvolvimento androgenético parece ser aquele anterior à mitose do micrósporo terminando logo após a divisão. Nessa fase parece ser sintetizada a maior parte do rRNA e tRNA, sendo que, logo após esse período, os genes responsáveis pela síntese destes ácidos nucleicos são desligados. Por isso, é essencial que as anteras sejam excisadas, ou durante, ou um período imediatamente anterior ou posterior à mitose, para que os grãos de pólen sigam a rota androgenética (VASIL e NITSCH, 1975).

A habilidade dos grãos de pólen em formar calos ou embrióides haplóides está

sob controle genético. Há evidências de que não há uniformidade entre diferentes anteras de um botão floral ou entre diferentes grãos de pólen de uma mesma antera. Geralmente, apenas 0,5 a 5% sofrem desenvolvimento androgenético (VASIL e NITSCH, 1975). Segundo Tsay et al. (1986), os micrósporos androgenéticos apresentam grande quantidade de lipídeos amorfos, dois núcleos, e representam 4% do total de micrósporos produzidos.

A seleção de gemas florais e anteras contendo grãos de pólen no estágio ótimo pode ser feita visualmente. Entretanto, os padrões utilizados podem requerer modificações se a planta doadora e as condições de crescimento forem alteradas (YANG e ZHOU, 1982).



**Fig. 3.** Esquema do desenvolvimento do grão de pólen  
Fonte: Peters et al. (1999).

### 3.3. Pré- tratamento

Pré-tratamento de inflorescências, gemas ou anteras a baixas temperaturas, antes da inoculação, aumenta a resposta dos micrósporos *in vitro*, e parece ser, particularmente, efetivo em gramíneas, como arroz, trigo, cevada e cana-de-açúcar. No entanto, em outras espécies tais como aspargo, não foi obtida resposta. Em brássicas, o pré-tratamento de botões florais à temperatura de 30°C, por 48-72 horas, tem efeito benéfico para indução de haplóides. Pode ser utilizado tanto antes quanto após a colocação das anteras no meio de cultura. A temperatura ótima e a duração do pré-tratamento variam com a espécie e dependem também do tipo de explante tratado, ou seja, perfilhos, inflorescências, gemas ou anteras isoladas (PETERS et al., 1999).

O pré-tratamento a frio diminui o metabolismo da antera, retardando a senescência da parede e aumentando a quantidade total de aminoácidos livres. O frio pode alterar a composição da membrana plasmática do pólen, aumentando a síntese e a incorporação de ácidos graxos insaturados que ampliariam a fluidez da membrana, aumentando a capacidade de sobrevivência dos grãos de pólen ao estresse pela troca de ambiente. O frio também sincronizaria a divisão celular, permitindo a formação de dois núcleos idênticos, que, dividindo-se, dariam origem a células idênticas (HEBERLE-BORS, 1985).

### 3.4. Composição do meio de cultura

Embora ocorra baixa produção de embrióides pela cultura de anteras em meio líquido e/ou sólido, em algumas espécies, como o fumo, o crescimento e a sobrevivência dos embriões/calos são estimulados pela adição de uma mistura diluída de sais minerais, uma fonte de carbono, vitaminas e, dependendo da espécie, de substâncias reguladoras de crescimento. As misturas de sais mais indicadas para cultura de anteras são as de Murashige e Skoog (1962) (Tabela 1), para solanáceas, e N<sub>6</sub> (CHU et al., 1975) para cereais.

**Tabela 1.** Composição dos meios de Murashige e Skoog (MS)(1962) e de Chu et al. (N<sub>6</sub>) (1975)

Substância (mg.L <sup>-1</sup> )	MS (mg.L <sup>-1</sup> )	N <sub>6</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	-
(NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>	-	463
KNO <sub>3</sub>	1900	2830
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	440	166
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	185
MnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	22,3	4,4
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	10,6	1,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	1,6
KI	0,83	0,83
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,25	-
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	-
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	2,78	2,78
Na <sub>2</sub> EDTA.2 H <sub>2</sub> O	3,72	3,72
Inositol	100	-
Glicina	2	2
Piridoxina	0,5	0,5
Tiamina	0,1	1,0
Sacarose	30000	50000



De acordo com Sunderland e Dunwell (1977), citados por Mantell et al. (1994), as espécies podem ser classificadas de acordo com a sua independência ou não de hormônios, conforme apresentado na Tabela 2. O meio de cultura é denominado simples quando não são necessários hormônios e complexo, no caso dos hormônios serem requeridos.

Segundo os autores, as espécies que não requerem hormônios no meio de cultura possuem, geralmente, pólen bicelular, enquanto as espécies cujos grãos de pólen desenvolvem-se somente na presença de hormônios produzem tanto pólen bicelular quanto triclular.

Este requerimento pode ser interpretado como um reflexo da competência morfogenética em anteras de diferentes espécies, sendo mais competentes aquelas espécies que não requerem hormônios. Portanto, em alguns casos ocorre uma proporção alta (acima de 50%) de grãos de pólen competentes em cada antera, que são capazes de desenvolver embriões, levando à produção direta de plântulas, *in vitro*.

Um sistema de dupla camada, meio líquido sobre meio com ágar, tem sido empregado com bons resultados para algumas espécies. Os calos produzidos em meio líquido apresentam menor taxa de regeneração que os induzidos em meio semi-sólido, porém podem ocorrer problemas decorrentes da toxicidade de impurezas presentes nos solidificantes, como o ágar. A concentração de agarose pode determinar a formação de embrióides ou calos. Em alguns casos, baixas concentrações estimulam e em outros reduzem. De maneira geral, são requeridos níveis mais elevados de sacarose para indução de divisão celular do que para a

**Tabela 2.** Espécies com e sem requerimento de hormônios nos meios para cultura de anteras e pólen

Simples (não requerem hormônios)	Complexo (requerem hormônios)
<i>Datura innoxia</i>	<i>Hordeum vulgare</i>
<i>Hycoscyamus niger</i>	<i>Oryza</i>
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Triticum</i>
<i>Nicotiana sylvestris</i>	<i>Triticale</i>
<i>Nicotiana knightiana</i>	<i>Zea mays</i>
<i>Nicotiana paniculata</i>	<i>Asparagus officinalis</i>
<i>Paeonia hybrida</i>	<i>Brassica campestris</i>

Fonte: Sunderland e Dunwell (1977), citados por Mantell et al. (1994)

regeneração das plantas. Normalmente, é utilizado 3% de sacarose no meio de diferenciação (PETERS et al., 1999).

### 3.5. Fatores físicos

Tanto a densidade quanto a posição de anteras e/ou micrósporos afeta a resposta *in vitro*.

### 3.6. Condições de cultura

Temperaturas muito altas podem induzir a formação de plantas albinas, principalmente em cereais. As mudanças bioquímicas induzidas por estes tratamentos ainda são indefinidas.

A presença de 2% de CO<sub>2</sub> estimula a formação de embrióides em cultura de anteras de várias espécies.

### 3.7. Genótipo da planta doadora

Genótipos responsivos são aqueles que não requerem condições de cultura altamente específicas. A capacidade de formar calo ou embrióides é hereditária, e parece que esta resposta é controlada por um número limitado de genes nucleares. Interações entre genótipos e ambientes devem ser levadas em consideração no desenvolvimento de protocolos para produção de plantas haplóides.

### 3.8. Cultura de micrósporos isolados

Os micrósporos são isolados de todos os demais tecidos da antera, coletados e concentrados, antes de serem cultivados em meio líquido. O isolamento dos micrósporos pode ser feito de maneira passiva, por deiscência das anteras, ou por rompimento mecânico das anteras seguido por purificação, ou seja, centrifugação seqüencial e ressuspensão das células em meio novo.

Mesmo com taxas de regeneração muito elevadas (de até 2700 plantas verdes por 100 anteras doadoras) para certos genótipos responsivos, alguns

pesquisadores não acreditam na viabilidade de cultura de micrósporos isolados para produção rotineira de duplo-haplóides (LUCKETT e DARVEY, 1992).

As principais vantagens da cultura de micrósporos em relação a cultura de anteras são (PETERS et al., 1999):

- a) os micrósporos não ficam limitados pela parede das anteras e, assim, tornam-se livres de parte dos efeitos maternos;
- b) aparentemente os micrósporos oferecem um sistema mais eficiente do que a cultura de anteras para regenerar uma amostra aleatória de plantas;
- c) podem ser combinados procedimentos de seleção de células isoladas com as vantagens de um sistema haplóide, quais sejam: ausência de quimerismo, expressão de todos os genes (dominantes e recessivos) e regeneração de linhagens homozigotas após a duplicação dos cromossomos;
- d) evita-se a formação de calos, o que reduz a variação gametoclinal, resultando em uma maior proporção de linhagens com bom desempenho agrônômico;
- e) permite o estabelecimento de condições mais uniformes de nutrição do que dentro das anteras, onde freqüentemente observam-se efeitos de posição.

### 3.9. Regeneração de plantas

Dependendo do sistema de regeneração, a formação de plantas haplóides, diplóides e poliplóides, a partir da cultura de anteras, pode ocorrer por meio da embriogênese direta (trigo, cevada, fumo), da embriogênese indireta (cevada, arroz) e pela organogênese indireta (arroz, cevada). Os calos derivados de micrósporos são, geralmente, transferidos para meios com elevada relação de citocininas/auxinas, para induzir a regeneração de brotos aéreos. Vários estudos tem demonstrado a importância da transferência imediata dos calos, após sua formação, para o meio de regeneração (CHEN, 1986b).

### 3.10. Aclimação de plantas e duplicação de genomas

O processo de aclimação é uma das etapas mais importantes para o sucesso desta técnica. Dependendo da espécie, essa etapa pode representar grandes perdas do material produzido *in vitro*.

Para a restauração da fertilidade e utilização no melhoramento, as plantas haplóides devem ter seu genoma duplicado, sendo a colchicina o agente mais comumente usado.

#### **4. Variabilidade genética nas culturas *in vitro* haplóides**

##### **4.1. Suspensões celulares originadas de tecidos androgenéticos**

Suspensões celulares embriogênicas haplóides, originadas de pólen podem ter grande importância nos trabalhos de seleção *in vitro*, de transformação genética e de pesquisa com protoplastos. O melhor material de partida para se estabelecerem suspensões celulares com capacidade de regeneração e para servir de alvo à introdução de plasmídeos são os próprios embriões androgenéticos. Com efeito pode-se estabelecer em poucas semanas organogênese, constituindo, portanto, bom material de escolha para transformação (MOARES-FERNANDES et al., 1999).

##### **4.2. Seleção *in vitro* de variantes originados de micrósporos**

Em geral, culturas de microsporos são embriogênicas, podendo ser empregadas para seleção *in vitro* de variantes genéticos.

As vantagens de combinar a seleção *in vitro* com a cultura de anteras são as seguintes (YE et al., 1987):

- 1) Há mais ou menos 3000 grãos de pólen dentro de uma única antera, o que permite selecionar, em um estágio de desenvolvimento muito precoce e em um período muito curto, mutantes raros entre milhões de micrósporos de um híbrido ou de materiais tratados com mutagênicos;
- 2) Mediante a duplicação espontânea ou induzida dos cromossomos, é possível obter um grande número de diplóides homozigotos portadores do caráter desejado.

### 4.3. Variação gametoclonal

A produção de variabilidade genética herdável, em frequências superiores às taxas de mutação espontânea, na cultura de tecidos gaméticos, ou variação gametoclonal, é bem menos extensiva do que a variação somaclonal em culturas envolvendo tecidos somáticos de plantas (MORAES-FERNANDES et al., 1999).

Em geral, espécies poliplóides exibem níveis mais elevados de variação somaclonal do que espécies diplóides. Isso ocorre porque a poliploidia confere uma capacidade maior de tamponamento genético e maior tolerância a alterações cromossômicas.

Em contraste, com mutações genéticas resultantes de alterações no DNA ou nos cromossomos, variações epigenéticas podem ocorrer. O critério considerado aceitável para distinguir uma modificação genética de uma epigenética é a transmissão do caráter após a reprodução sexual. Uma modificação epigenética caracteriza-se por ser transmitida apenas por divisões mitóticas, mostrando reversibilidade ao atravessar processos de diferenciação ou da meiose (CHALLEFF, 1983).

### 4.4. Transformação genética de espécies utilizando cultura de anteras

Zhang et al. (2001), introduziram resistência a *Puccinia striiformis* e *Erysiphe graminis* em trigo por cultura de anteras do cruzamento entre triticales hexaplóide e trigo aneuplóide, pela introdução do cromossomo 6R do centeio, *Secale cereale* L., carregando o gene Pm20. Uma linhagem hexaplóide de triticales (x *Triticosecale* Wittmack) foi cruzada com trigo nulissômico, conduzida para cultura de anteras da geração  $F_1$ . Obtiveram como resultado, uma linha duplo-haplóide estável e resistente a ambas doenças.

## 5. Vantagens e limitações da haploidização

Pelo fato de originar plantas homozigotas, derivadas dos micrósporos, que representam diretamente a segregação gamética após a meiose de indivíduos híbridos ( $F_1$ ), a haploidização significa uma poderosa estratégia tecnológica, principalmente para as culturas autogamas. Ao eliminar-se o mascaramento

causado pelo heterozigose, soluciona-se uma das principais limitações dos métodos de melhoramento, ou seja, a dificuldade e a aleatoriedade da seleção das populações  $F_2$ .

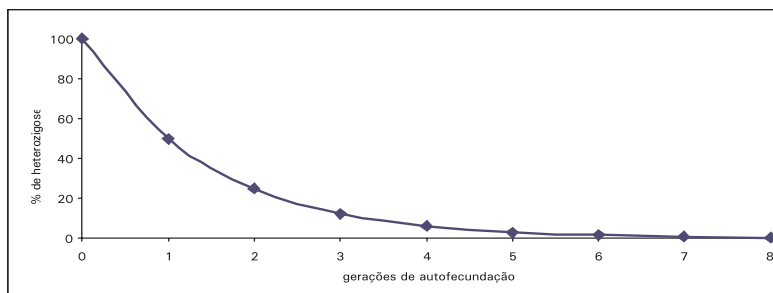
Há previsão de que a haploidização facilitará o desenvolvimento de linhagens puras de cereais, trazendo (PICARD et al., 1990):

- a) maior variância genética;
- b) substancial economia de tempo;
- c) melhor resposta à seleção, em decorrência da homozigose;
- d) grande valor como teste para identificar cruzamentos promissores.

Em plantas de polinização cruzada, altamente heterozigotas, a produção de haplóides *in vitro* possibilita a obtenção de linhagens puras, que podem ser utilizadas como progenitores no desenvolvimento de cultivares híbridas.

### 5.1.Economia de tempo

Em um sistema de melhoramento convencional, a homozigose é alcançada somente após 7 a 9 gerações de autofecundação, permanecendo sempre uma pequena proporção de heterozigose residual (Figura 4). A produção de haplóides de populações híbridas  $F_1$  e  $F_2$  permite aos melhoristas a obtenção de linhagens



**Fig. 4.** Gráfico demonstrando número de gerações de autofecundação e taxas de heterozigose, a partir do cruzamento entre duas linhas puras. Assim, uma geração de autofecundação corresponde a geração  $F_2$  do cruzamento.

homozigotas em uma geração, após a duplicação do genoma, que pode ser espontânea ou induzida com colchicina. Como as linhagens homozigotas são obtidas em apenas uma geração, em culturas anuais, a diminuição do tempo necessário para produzir uma nova linhagem, para germoplasma ou experimentação, visando ao lançamento de uma nova cultivar, será tanto maior quanto mais cedo a haploidização for utilizada.

## 5.2. Economia de custos

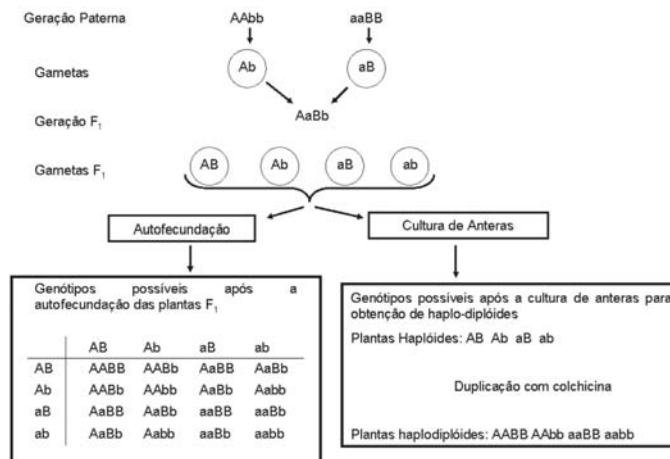
Ao eliminarem as sementeiras e avaliações de linhas segregantes, obtém-se também diminuição de trabalho e espaço nos campos experimentais.

## 5.3. Eficiência de seleção

Segundo Snape (1989), a cultura de anteras aumenta a eficiência da seleção, tanto para os caracteres qualitativos quanto para os quantitativos, facilitando a identificação de genótipos superiores, em comparação com a seleção efetuada durante as primeiras gerações do método pedigree. Normalmente, a seleção de indivíduos em uma população  $F_2$  é mais efetiva para alelos dominantes, enquanto os genótipos recessivos só estão presentes na proporção  $(1/4)^n$ , sendo  $n$ , o número de genes. Ao contrário, uma população de duplo-haplóides, os genótipos recessivos tem uma frequência de  $(1/2)^n$ , considerando que foi obtido da geração  $F_1$  de um cruzamento entre duas linhas puras. Isso facilita a seleção de genes recessivos desejáveis, já que não existe o mascaramento causado pela dominância. Teoricamente, se os genitores do híbrido tem 'n' pares de alelos recombinando-se independentemente, para se selecionar um genótipo de uma população  $F_2$ , a eficiência de seleção deve ser  $(1/2)^{2n}$  no melhoramento com duplo-haplóides e  $(1/2)^n$  no melhoramento com diplóides (Figura 5). Isso indica que a eficiência de seleção no melhoramento com duplo-haplóides é 2<sup>n</sup> vezes superior àquela do melhoramento com diplóides.

## 5.4. Alta dependência do genótipo

Embora sensível ao ambiente, o processo androgenético é, ao mesmo tempo, altamente herdável. Há suposição de que a resposta androgenética esteja parcialmente sob controle de elementos genéticos instáveis, nucleares e



**Fig. 5.** Vantagens do uso da haploidia no melhoramento, considerando dois genes com dois alelos.

citoplasmáticos, provavelmente independentes, uma classe atuando sobre diferenciação embriogenética e outra sobre a regeneração de plantas, já que não se encontrou correlação entre estes dois processos (PICARD et al., 1993).

### 5.5. Variabilidade genética nas populações resultantes da haploidização

Considerando que cada grão de pólen proveniente de plantas híbridas F<sub>1</sub> representa um gameta genotipicamente diferente, a população das plantas duplo-haplóides deveria exibir a mesma variabilidade genética encontrada em uma geração F<sub>2</sub>, com a vantagem adicional de que cada indivíduo tem um genótipo homozigoto.



## Referências Bibliográficas

- CHALEFF, R.S. Considerations of development biology for the plant cell geneticist. In.: KOSUGE, T.; MEREDITH, C.P.; HOLLAENDER, A. (ed.). **Genetic engineering of plants: an agricultural perspective**. New York: Plenum, 1983. p. 157-170
- CHU, C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; HSU, C.; YIN, K.C.; CHU, C.Y.; BI, F.Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative of the nitrogen sources. **Scientia Sinica**, v. 18, p. 659-668, 1975
- HEBERLE-BORS, E. *In vitro* haploid formation from pollen: a critical review. **Plant Science**, v. 71, p. 361-374, 1985
- MANTELL, S.H.; MATHEWS, J.A.; MCKEE, R.A. **Princípios de biotecnologia em plantas: uma introdução a engenharia genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1994, 344 p.
- MORAES-FERNANDES, M.I.B. Perspectivas da biotecnologia para o melhoramento de plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.22, p. 881-886, 1987
- MORAES-FERNANDES, M.I.B.; STIVAL, A.N.; BRAMMER, S.P.; GRANDO, M.F. Haploidização: Genética e Melhoramento. In.: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa- SPI, 1999. p. 613-650
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962
- PETERS, J.A.; BOBROWSKI, V.L.; ROSINHA, G.M.S. Produção de haplóides e duplo-haplóides. In.: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1999. p. 569-611

PICARD, E.; RODE, A.; DOUSSINAULT, G.; ROUSSET, M.; RIVES, M. Wheat (*Triticum aestivum*): *in vitro* production and utilization of doubled haploids. In.: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Haploids in crop improvement**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. p. 101-124

SNAPE, J.W. Doubled haploid breeding: theoretical basis and its practical applications. In. SNAPE, J.W. **Review of advances in plant biotechnology, 1985-1988**. Manila: IRRI, 1989. p. 19-30

TSAY, S.S.; TSAY, H.S.; CHAO, C.Y. Cytochemical studies of callus development from microspore in cultured anther of rice. **Plant Cell Reports**, v.5, p. 119-123, 1986

VASIL, I.K.; NITSCH, C. Experimental production of pollen haploids and their uses. **Zeitschrift für Pflanzenzüchtung**, v.76, p. 191-212, 1975

VIEIRA, M.L.C.; APEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Fundamentos e aplicações da cultura de tecidos no melhoramento. In.: NASS, L.L.; VALOIS, A. C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. **Recursos genéticos e melhoramento: plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p. 911-938

YANG, H.; ZHOU, C. *in vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. **Theoretical and Applied Genetics**, v.63, p. 97-104, 1982

YE, J.M.; KAO, K.N.; HARVEY, B.L.; ROSSANAGEL, B.G. Screening salt-tolerant barley genotypes via  $F_1$  anther culture in salt stress media. **Theoretical and Applied Genetics**, v.74, p. 426-429, 1987.



**Embrapa**

---

**Algodão**

**Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento**

